The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ミトコンドリア型グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素（mGOT）前駆体型の諸性質
Author(s)	堀尾, 嘉幸
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34633
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【30】

氏名・（本籍）	堀（ほり） 尾（お） 嘉（よし） 幸（ゆき）
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　6824　号
学位授与の日付	昭和60年3月25日
学位授与の要件	医学研究科　生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ミトコンドリア型グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素（mGOT）前駆体型の諸性質**
論文審査委員	（主査） 教授　和田　博 （副査） 教授　山野　俊雄　教授　田川　邦夫

論文内容の要旨

（目　的）

ミトコンドリア型グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素（mGOT）は，核に遺伝子が存在し，細胞質で分子量が約2,000ダルトン大きい前駆体型として合成されたあと，ミトコンドリアの外膜及び内膜の2枚の膜を透過してミトコンドリアマトリックスに局在化する。この機構を解明する目的で，前駆体型mGOTの諸性質を明らかとする。

（方法ならびに成績）

(1) SD系ラット肝臓500gよりHuynhらの方法によりmGOT約25mgを精製し，1回0.5mgをAdjubantとともに3週間おきに4回家兎に免疫し，抗mGOT血清を得た。

(2) ウサギ兎網状赤血球溶解液はアセチルフェニルヒドラジン30mgを1日1回，1週間皮下注射した家兎赤血球より調製し，ヌクレアーゼで内在性mRNAを分解後セファデックスG－50でゲル濾過し，遊離アミノ酸を除去したものを用いた。

(3) total RNAはSD系ラット肝臓よりグアニジンチオシアネート－塩化セシウム密度勾配遠心を用いて分離し，poly A－RNAはオリゴdTセルロースカラムを用いて得た。

(4) ^{35}S－メチオニン存在下で，網状赤血球蛋白合成系を用いて前駆体型mGOTを合成し，別に分離調製したラット肝臓ミトコンドリアを等張条件下でincubationしたあと，ミトコンドリア内にとりこまれた蛋白質をSDS－PAGEフルオログラフィーで分析した。前駆体型mGOTは，時間とともにミトコンドリア内にとりこまれ，同時に分子量も2000ダルトン小さい成熟型に転換した。

(5) ラット肝臓poly A－RNAを^{3}H－プロリン，または^{3}H－ロイシン，または^{35}S－メチオニンと

その他の19種類の“コールド”アミノ酸の存在下で網状赤血球蛋白合成系を使ってトランスレーションし，抗mGOT抗体とプロテインAを用いて前駆体型mGOTを免疫沈澱させた。この免疫沈澱産物をEdman分解し，各ステップに回収されるアイソトープ量をシンチレーションカウンターにより測定した。これにより前駆体部分のmGOT構造はN末端よりMet-Leu-Leu-X-X-Leu-Pro-X-X-Leu-Leu-Leu-であることがわかった。（X：Unknown）

(6) 前駆体型mGOTの分子量の測定

網状赤血球蛋白合成系を使って合成した前駆体型mGOTを含む分画をSDS存在下及び非存在下でHPLC－TSKSW 3000ゲル濾過カラムにかけ，各フラクションを抗mGOT抗体と反応させた後，SDS－PAGEで分析し，前駆体型mGOTの分子量を測定した。この結果SDS非存在下では前駆体型mGOTは成熟型mGOTと同じく二量体の構造をとり，SDS存在下で一量体になることが示唆された。

(7) 前駆体mGOTと補酵素（ピリドキサールリン酸）の結合

mGOTはピリドキサールリン酸（PLP）を補酵素として結合している。前駆体型mGOTとPLPの関係を知るために，網状赤血球蛋白合成系を使って合成した分画に関してPLP除去した“apo状態”とPLPを添加した“holo状態”を作り，PLPを結合させたAHーセファロースカラムとの結合性を見た。前駆体型mGOTは“holo状態”ではPLPーカラムに結合せず“apo状態”にするとPLPカラムに結合した。この結果，前駆体型mGOTも補酵素を結合し得ることがわかった。

(8) ラットmGOTcDNAのクローニング

前駆体型mGOTの構造を決定するためにラットmGOTcDNAのクローニングを試みた。pUC8発現ベクターに組み込んだラット肝臓cDNAライブラリー約5万個を抗mGOT抗体でスクリーニングし，抗体と反応性のあるクローンpm-1を得，解析中である。

（総　括）

1) 前駆体型mGOTは成熟型への分子量の減少を伴って，ミトコンドリア内に取り込まれた。
2) ミトコンドリア内への局在化機構をになうmGOTの前駆体部分の一部の構造をラジオシークエンス法で決定した。
3) 前駆体型mGOTは二量体の構造をとり，かつ補酵素のピリドキサールリン酸を結合でき，成熟型mGOTと非常に近い性質をすでにもっていることが示された。
4) ラットmGOTcDNAのクローニングを行い抗mGOT抗体と反応するクローンpm-1を得た。

論文の審査結果の要旨

ラットのmGOTをウサギ網状赤血球蛋白合成系を使って*in vitro*で合成したところ，mGOTは精製したmGOTより分子量が約2,000大きな前駆体型として合成され，また，*in vitro*の系でミトコンドリアと共存させることにより，この前駆体型mGOTはミトコンドリア内に移行した。前駆体型

mGOT は成熟型 mGOT と同様に二量体として存在し，また，補酵素ピリドキサール 5'-リン酸を結合することが出来，成熟型 mGOT と非常に近い性質を持っていた。これを用い，前駆体のN末端部の構造を決定し，疎水性アミノ酸が多いことを明らかとした。

以上は，mGOT のミトコンドリア内局在化機構を解明する上でいづれも重要な手掛りを与えるものであり，この方面の研究に新しい展開をもたらしたものとして，学位論文として推薦し得る。